

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA RELATIVA DE TOXINAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE *Escherichia coli* COLETADAS DE BEZERROS COM DIARRÉIA, DO RECÔNCAVO BAIANO.

Gabrielle Casaes Santana¹; Claudio Roberto Nobrega Amorim²

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduanda em Bacharelado em Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, casaesgabrielle@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, amorim@uefs.br

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é uma enterobacteriaceae gram-negativa e anaeróbica facultativa. Certas características bioquímicas a distinguem das outras bactérias como por exemplo, a capacidade de fermentar lactose, produzir indol e reduzir nitrato (AZOLA, 2016). A *E. coli* faz parte da microbiota residente do lúmen intestinal e não causa dano ao indivíduo, entretanto, cepas patogênicas podem causar enfermidades em variados vertebrados (STELLA, 2009). Dentre essas enfermidades, a colibacilose é causada pela *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e acomete animais neonatos causando vários níveis de diarreia e desidratação (RECK, 2009). A ETEC tem como característica principal a produção de duas enterotoxinas: a termolábil (LT) e a termoestável (ST). Ao produzir essas toxinas, a *E. coli* induz um aumento na secreção de líquido no lúmen intestinal, como consequência da diminuição da absorção de sódio feita pelas células afetadas, resultando em diarreia (ALMEIDA, 2013; ANDRADE, 2013; RECK, 2009;). Apesar de todas essas toxinas serem produzidas pela ETEC, algumas ainda não foram encontradas em bezerros, como é o caso da STb, LT-I e LT-IIc (AZOLA, 2016; NAWAR et al. 2010).

Objetivou-se com esse estudo analisar a frequência relativa das toxinas identificadas em amostras de *Escherichia coli* coletadas de fezes diarreicas de bezerros neonatos, no recôncavo da Bahia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Identificação bioquímica

Foram utilizadas 25 amostras de fezes diarreicas de bezerros neonatos, analisadas no laboratório de Microbiologia Aplicado à Saúde (LAMASP), da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). As amostras foram diluídas em meio tamponado pH 7,4 e semeadas em BHI a 35° por 24h. As culturas que apresentaram crescimento foram semeadas em Agar Eosina-Azul de Metileno e incubadas a 35° por 24h. As colônias que cresceram e apresentaram coloração verde metálico foram consideradas suspeitas de serem *E.coli* e seguiram para a identificação bioquímica. Os testes bioquímicos realizados foram: utilização de lactose, motilidade e descarboxilação de lisina, fermentação de carboidrato, produção de uréase e produção de sulfeto de hidrogênio, testes vermelho metila e Voges, teste do Indol e citrato de Simmon's. A confirmação foi feita inoculando as amostras positivas para todos os testes mencionados em caldo EC, em banho maria por 24/48h a 45°C.

A detecção da toxina hemolisina foi feita segundo a metodologia empregada por RIBEIRO *et al.* (2006), com modificações. A bactéria foi cultivada em placas de Petri contendo meio ágar sangue (5%) a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas,

Extração do DNA e Reação da PCR

O DNA foi extraído das amostras que apresentaram turbidez e liberação de gás no Caldo EC. Utilizou-se 0,2µL da amostra de *Escherichia coli* inoculada no caldo EC. O protocolo de extração utilizado foi o disponibilizado pelo Canadian Centre for DNA Barcoding, com modificações. Foi-se igualmente extraído DNA da linhagem padrão positiva PCLT-IIc e 5677STa para as toxinas LT-IIc e STa, como controle positivo.

Utilizou-se para a reação de PCR (25uL), 1µL de DNA a 100ng/µL (100pMol), 1µL de dNTP (10mM), 0,8µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de Primer 1 (10pMol), 1µL de Primer 2 (10pMol), 0,5µL de EasyTaq® DNA polymerase (2,5U), 2µL de Buffer 10x. A quantificação do DNA foi realizada com o auxílio espectrofotômetro NanoDrop. A amplificação dos genes de LT se deu em um termociclador onde o programa consistiu em: um estágio inicial de 5 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos (60°C para o gene da toxina STa), e extensão a 72°C por 30 segundos. Adicionado a isso, um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. A descrição dos primers, bem como o tamanho do produto esperado está descrito na tabela 1.

Tabela 1. Lista de primers utilizados na reação da PCR.

Primer	Sequência	Tamanho do produto esperado	Referência
LT-II	5-AGATATAATGATGGATATGTATC-3	300	SALVADORI et al. (2003)
	5-TAACCCTCGAAATAAATCTC-3		
STa	5-TCCGTGAAACAACATGACGG-3	244	SALVADORI et al. (2003)
	5-ATAACATCCAGCACAGGCAG-3		

A análise foi feita em gel de agarose em cuba eletroforética nas condições de 110V por 40 minutos. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foi determinado pelo marcador molecular de 100pb Ladder 1µg/µL. O gel foi corado utilizando Coraload 10x e Gel Red e foram visualizados em transiluminador UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras apresentaram crescimento verde metálico quando cultivadas em EMB, demonstrando que se tratavam de bactérias gram-negativas. O resultado positivo dos testes bioquímicos que indicaram que se tratava de *Escherichia coli*, foram: Agar MacConkey, Vermelho Metila (VM), produção de indol e descarboxilação de lisina. Os resultados negativos foram para os testes Voges-Proskauer (VP), produção de sulfeto de hidrogênio, utilização de citrato e motilidade. Segundo FORTES (2010) a motilidade em *E. coli* é variável a depender da cepa analisada e por essa razão não possuem relação direta com a patogenicidade. O que explica a ausência da motilidade nas amostras.

A análise da eletroforese indicou que todas as amostras apresentaram resultado positivo para a produção de LT-II (Figura 1). Nesse caso, a frequência relativa das amostras analisadas foi de 100%. Podendo inferir que ao nível de 95% de confiança, o intervalo de confiança para as amostras analisadas é de 100%. Na literatura, é possível encontrar registros de LT em amostras patogênicas de *E. coli*, oriundas de fezes diarreicas de bezerro, mas não todos os subtipos, sendo encontrado apenas LT-II (AZOLA, 2016; JOBLING, 2016; COURA et al., 2014; STELA, 2009; UGRINOVICH et al. 2002. A toxina LT-II se subdivide em LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc, destas, foram identificadas em bezerros apenas LT-IIa e LT-IIb, sendo que LT-IIc foi descrito recentemente por NAWAR (2010) e encontrado apenas em amostras de aves doentes (JOBLING,

2016; NAWAR, 2010. A amostra padrão (PCLT-IIc) utilizada para a reação da PCR é positiva para o gene LT-IIc. As bandas que se formaram na eletroforese (Figura 1) indicam que todas as amostras apresentam bandas similares a que se formou no poço da amostra padrão. Nesse caso, há probabilidade das cepas de *E. coli* analisadas apresentarem o gene para produção da toxina LT-IIc, ainda não encontrado em bovinos.

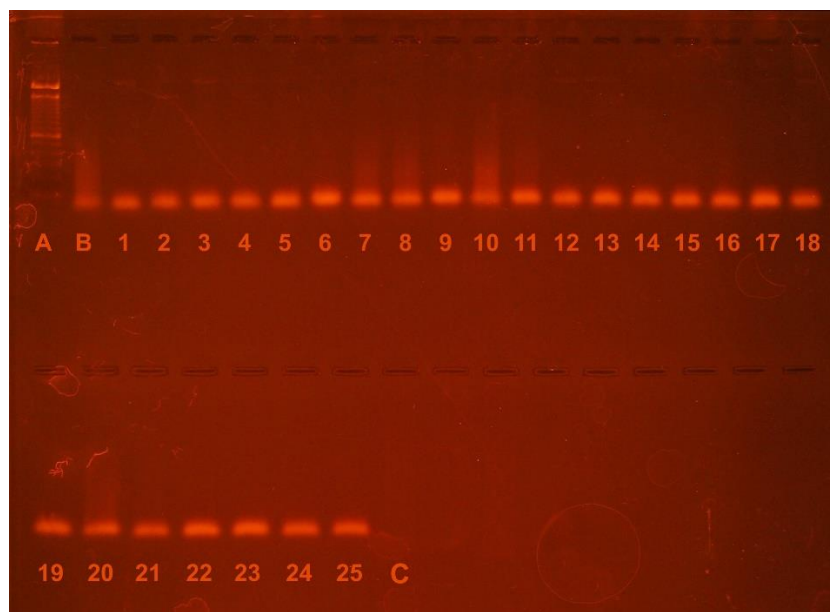


Figura 1: Eletroforese em Gel de Agarose. **A:** Ladder 100pb; **B:** Amostra Padrão PCLT-IIc (Controle positivo); **1-25:** Amostras, onde: **1:** 3776(4); **2:** 3776(5); **3:** 3399(1); **4:** 3399(3); **5:** 3399(4); **6:** 3399(5); **7:** 3350(1); **8:** 3350(2); **9:** 3350(4); **10:** 3350(5); **11:** 3718(1); **12:** 3718(3); **13:** 3718(4); **14:** 3718(5); **15:** 3376(1); **16:** 3376(2); **17:** 3376(3); **18:** 3376(4); **19:** 3376(5); **20:** 3247(2); **21:** 3247(3); **22:** 3247(4); **23:** 3247 (5); **24:** 3680(1); **25:** 3680(3); **C:** Controle negativo

A presença de hemolisina foi negativa em 100% das amostras e não foi verificado halo hemolítico parcial nem total (Figura 3, 4 e 5). É possível encontrar trabalhos em que a produção de hemólise por *E. coli* é variável, dependendo da cepa analisada (COSTA *et al.*, 2014; FORTES, 2008; SALVADORI *et al.*, 2003). Segundo ALMEIDA (2013), a produção de hemolisina é importante, pois, dessa forma a bactéria consegue capturar ferro, através da lise de eritrócitos. A frequência de hemolisina é maior em amostras de *Escherichia coli* provenientes de fezes diarreicas de suíno, o que pode explicar a ausência dessa toxina em nossas amostras (QUINN *et al.* 2005).

CONCLUSÃO

Conclui-se que das 100% amostras analisadas, apresentaram o gene para a produção da toxina LT, podendo ser dos subtipos existentes o LT-IIc, ainda não encontrado em fezes diarreicas de bezerros, sendo, portanto, a toxina mais encontrada nas amostras. Também pode-se afirmar que 100% das amostras não são hemolíticas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M. de S; 2013. **Características biológicas e antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia

ANDRADE, F.B.; 2013. **Padronização e avaliação de PCR multiplex para o diagnóstico de *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, Instituto Butantan. São Paulo.

AZOLA, J.S.M.; 2016. **Genes de virulência e perfil de susceptibilidade a extratos vegetais de isolados de *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC), Shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em bezerros.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

COURA, F.M *et al.*; 2014. **Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização.** Pesq. Vet. Bras. 34(9):811-818.

FORTES, F. B. B.; 2008. **Perfil Bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

JOBLING, M.G.; 2016. **The chromosomal nature of LT-II enterotoxins solved: a lambdoid prophage encodes both LT-II and one of two novel pertussis-toxin-like toxin family members in type II enterotoxigenic *Escherichia coli*** Pathogens and Disease. 2016, 74 (3).

NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; 1998. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** Clinical Microbiology Reviews; 11(1): 142-201

NAWAR *et al.*; 2010. **LT-IIc, a New Member of the Type II Heat-Labile Enterotoxin Family Encoded by an *Escherichia coli* Strain Obtained from a Nonmammalian Host.** Infection and Immunity, 78 (11): 4705–4713.

RECK, M.V.M., 2009. **Diarréia Neonatal Bovina.** Porto Alegre, UFRGS. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/22919/000735566.pdf?sequence=1>>. Data de acesso: 14 Ago 2017.

RIBEIRO, M.G *et al.*; 2006. **Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isolados de mastite bovina.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 58(5): 724-731.

SALVADORI, M. R. *et al.* 2003. **Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology 34: 230-235.

SANTOS, C. M. 2014. **Toxinas termo-labéis (LTs) do tipo II de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória.** Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de ciências biomédicas. Universidade de São Paulo.

STELLA, A.E.; 2009. **Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto- SP, Brasil.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP. São Paulo.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. (Ed.). **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Porto Alegre: Artmed, 2005. Pp. 512.

UGRINOVICH *et al.*; 2002. **Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil LT-II em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Jaboticabal, SP, Brasil.** Ciência Rural, Santa Maria, 32(2): 289-291.